

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2002年1月24日 (24.01.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/06305 A1(51)国際特許分類⁷: C07K 1/14, 14/01, C12N 15/02, C07K 16/00, C12P 21/08, G01N 33/15, 33/50

柏江市岩戸南3丁目6番27号 Tokyo (JP). 児玉龍彦 (KODAMA, Tatsuhiko) [JP/JP]; 〒154-0002 東京都世田谷区下馬4-16-5 Tokyo (JP). 岩成宏子 (IWANARI, Hiroko) [JP/JP]. 伊藤行夫 (ITO, Yukio) [JP/JP]; 〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目1番10号 日本生命水道橋ビル 株式会社 特殊免疫研究所内 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP01/06109

(74)代理人: 藍原 誠, 外 (AIHARA, Makoto et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2001年7月16日 (16.07.2001)

日本語

(25)国際出願の言語: 日本語

(81)指定国(国内): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26)国際公開の言語: 日本語

(84)指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30)優先権データ:
特願2000-215416 2000年7月17日 (17.07.2000) JP添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 特殊免疫研究所 (INSTITUTE OF IMMUNOLOGY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-0004 東京都文京区後楽1丁目1番10号 日本生命水道橋ビル Tokyo (JP). 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸ノ内ビルディング6階 Tokyo (JP).

(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 浜窪隆雄 (HAMAKUBO, Takao) [JP/JP]; 〒201-0005 東京都

(54)Title: METHOD OF COLLECTING VIRAL ENVELOPE FROM GERMINATING BACULOVIRUS

(54)発明の名称: バキュロウイルスの発芽ウイルスからウイルスエンベロープを回収する方法

(57)Abstract: It is intended to provide a method of collecting the enucleated virion envelope (EVE) in which a target protein is expressed by separating the viral envelope from the nucleocapsid of a germinating virus. Namely, a method of collecting the viral envelope comprising treating a germinating baculovirus, in which a target protein is expressed, by a physicochemical treatment and thus separating the viral envelope from the nucleocapsid of a germinating virus.

(57)要約:

本発明の目的は、発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープを分離し、目的膜蛋白質が発現されたウイルス膜画分 (enucleated virion envelope, EVE) を回収する方法を提供することである。本発明によれば、目的蛋白質が発現されたバキュロウイルスの発芽ウイルスを物理化学的手法で処理することを含む、該発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープとを分離してウイルスエンベロープを回収する方法が提供される。

WO 02/06305 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

バキュロウイルスの発芽ウイルスからウイルスエンベロープを回収する方法

技術分野

本発明は、バキュロウイルスの発芽ウイルスからウイルスエンベロープを回収する方法に関する。より詳細には、本発明は、目的蛋白質が発現されたバキュロウイルスの発芽ウイルスを物理化学的手法で処理することを含む、該発芽ウイルスからウイルスエンベロープを回収する方法に関する。本発明はまた、上記回収方法を利用した化学物質のスクリーニング方法、抗体の作製方法、及び目的蛋白質の精製方法に関する。

背景技術

バキュロウイルスと昆虫細胞を用いた蛋白質の発現系は、膜蛋白質の発現系として広く用いられている。このような発現系は、大腸菌や酵母を用いる発現系に比べ、凝集物を作りにくく、糖鎖の付加や金属イオンの配位などタンパク質の機能に必要な翻訳後修飾が入るなど利点が多い。

バキュロウイルス発現系はバキュロウイルスの多角体蛋白質などのウイルス遺伝子のプロモーターを利用して、目的遺伝子を昆虫細胞で大量に発現させるシステムである。

通常、昆虫細胞から発現蛋白質が回収されるが、7回膜貫通型受容体 (Loisel TP, Ansanay H, St-Onge S, Gay B, Boulanger P, Strosberg AD, Marullo S, Bouvier M., Nat Biotechnol. 1997 Nov;15(12):1300-4., Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles.) や特願2000—158294号明細書に記載されている様々な膜蛋白質がウイルスのエンベロープに発現されることが報告されている。

ウイルスのエンベロープに発現された膜蛋白質は昆虫細胞に発現された蛋白質

に比べ、機能を保持している蛋白質の割合が多いことが報告されている。すなわち、発現蛋白質の利用法としては、Sf 9などの昆虫細胞に発現された蛋白質を利用する方法に加えて、ウイルスのエンベロープに発現された膜蛋白質を利用する方法が新たに考えられるようになってきた。またウイルスのエンベロープに存在する唯一のウイルス膜蛋白質である gp 6 4 に目的蛋白質を融合、ウイルスエンベロープ上にディスプレイする方法 (Novagen, pBACsurf-1 expression system) を用いて目的蛋白質に対するモノクローナル抗体を作成する方法が報告された (Lindley K.M., Su J-L., Hodges P.K., Wisely B., Bledsoe R.K., Condreay J.P., Winegar D.A., Hutchins J.T., Kost T.A. Production of monoclonal antibodies using recombinant baculovirus displaying gp64-fusion proteins. Journal of Immunological Methods 234, 2000, 123-135)。

上記したように、バキュロウイルス発現系では、従来のように Sf 9などの昆虫細胞に発現された蛋白質を利用する系、分泌されるタンパク質を利用する系に加えて発芽ウイルスに発現されたタンパク質を利用する系がモノクローナル抗体作成等に新たに使用され始めている。

バキュロウイルスには封入体由来ウイルス (occlusion derived virus, ODV) と発芽ウイルス (budded virus, BV) の2種類の生活環があり、それぞれ昆虫個体間感染および個体内細胞間感染の過程に適合している。両者ともウイルス DNA と構造タンパク質でできたヌクレオカプシッド(nucleocapsid)とよばれる部分を中心として、それを包むウイルスエンベロープ (virion envelope) とよばれるウイルス膜とからできている。ウイルスエンベロープにはウイルス由來の膜蛋白質としては gp 6 4だけが知られている。上記の発芽ウイルスに発現されている膜蛋白質はこのウイルスエンベロープに存在していると考えられる。

膜蛋白質はホルモンや化学物質の受容体を始め、チャネル蛋白質、物質輸送に関与する蛋白質、接着因子、膜酵素、酵素の基質蛋白質、酵素の活性化因子、抗原提示に関与する蛋白質、高次構造形成に関与する蛋白質など細胞の生理的機能に関わる重要な機能を有している。これらの膜蛋白質を発現させ、その機能を利

用できるシステムを構築することは医薬品の開発やバイオセンサーの開発、モノクローナル抗体の作成などにつながる重要な技術である。

しかしながら、発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープを分離し、目的膜蛋白質が発現されたウイルス膜画分（enucleated virion envelope, EVE）を回収する簡易な方法はこれまでの所、報告されていない。

発明の開示

即ち、本発明は、発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープを分離し、目的膜蛋白質が発現されたウイルス膜画分（enucleated virion envelope, EVE）を回収する方法を提供することを解決すべき課題とした。

さらに、本発明は、上記した目的膜蛋白質が発現されたウイルス膜画分の回収方法を利用した、化学物質のスクリーニング方法、抗体の作製方法、及び目的蛋白質の精製方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、バキュロウイルスの発芽ウイルス（B u d d e d V i r u s）を物理化学的手法（具体的には、界面活性剤処理と密度勾配遠心分離との組み合わせ）で処理することにより、該発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープを分離し、目的膜蛋白質が発現されたウイルス膜画分（enucleated virion envelope, EVE）を回収することに成功し本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

- (1) 目的蛋白質が発現されたバキュロウイルスの発芽ウイルスを物理化学的手法で処理することを含む、該発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープとを分離してウイルスエンベロープを回収する方法。
- (2) 物理化学的手法による処理が、界面活性剤による処理または凍結融解による処理と密度勾配遠心による分離操作である、(1) に記載の方法。
- (3) 界面活性剤として tween20 を使用する、(1) 又は (2) に記載の方法。
- (4) 目的蛋白質が膜蛋白質である、(1) から (3) の何れかに記載の方法。

(5) (1)から(4)の何れかに記載の方法により得られる、目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープ。

(6) (1)から(4)の何れかに記載の方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを用いて、該ウイルスエンベロープ上に発現されている目的蛋白質と被験物質との相互作用を測定することを含む、化学物質のスクリーニング方法。

(7) (1)から(4)の何れかに記載の方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを用いて、該ウイルスエンベロープ上に発現されている目的蛋白質に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作製する方法。

(8) (7)に記載の方法により得られるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体。

(9) (1)から(4)の何れかに記載の方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを溶解剤で処理し、該目的蛋白質を可溶化および精製する方法。

図面の簡単な説明

図1は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた各画分のショ糖濃度と蛋白濃度の測定結果を示す。

図2は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた第3～18画分について、12%ポリアクリルアミド SDS電気泳動（SDS-PAGE）を行い、銀染色した結果を示す。

図3は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた第9画分の電子顕微鏡の図である。

図4は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた第10画分の電子顕微鏡のイメージである。

図5は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた第11画分の電子顕微鏡のイメージである。

図6は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた第12画分の電子顕微鏡のイメージ

である。

図7は、ショ糖密度勾配超遠心で得られた各画分とSREBP 2に対する特異抗体を用いてウェスタンプロットを行った結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施態様及び実施方法について詳細に説明する。

本発明の方法は、目的蛋白質を発現するバキュロウイルスの発芽ウイルスを物理化学的手法で処理することを含む、該発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープを分離する方法に関する。

本明細書で言う目的蛋白質とは、好ましくは膜蛋白質であり、より好ましくは膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質から選択される蛋白質である。

以下、膜蛋白質についてさらに詳細に説明する。

本明細書で言う「膜結合型」とは、蛋白質が細胞膜並びに細胞内小器官（例えば、小胞体やゴルジ体等）の形質膜に存在することを広く意味し、その蛋白質の種類は特に限定されない。好ましくは、膜結合型受容体、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子又は膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質は、細胞内小器官の膜結合蛋白質であり、例えば、小胞体やゴルジ体の膜に結合した蛋白質である。

膜結合型受容体としては、ホルモン、臭い、味、光などに対する7回膜貫通型受容体、LDL受容体やスカベンジャー受容体、成長ホルモンやインスリン、TNF α 、グルタミン酸等に対する1回膜貫通型受容体、GABA、アセチルコリン、リアノジンなどのイオンチャネル型受容体およびT細胞受容体、Fc受容体、などの複合体を形成するものなどが挙げられる。

膜結合型酵素としては、コレステロール代謝に関わるHMG-CoA還元酵素や

ACAT(acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase)、 7α -hydroxylaseなどがあげられる。また解毒に関わるシトクローム P450 系、ミトコンドリアに存在する ATP 合成酵素やシトクロム酸化酵素および還元酵素、NADH-Q 還元酵素などの電子伝達系酵素があげられる。またホルモンや調節因子、栄養因子などのプロセッシングに関わるプロセッシングプロテアーゼ群として S1P (site 1 protease)、furin、PC (proprotein convertase)、S2P(site 2 protease)、エンドセリン変換酵素 (endothelin converting enzyme)、アンギオテンシン変換酵素 (angiotensin converting enzyme)、neprilysin など、また notch シグナルなどのシグナル伝達系に関わる ADAMS(a disintegrin and metalloprotease) family や細胞外基質の分解に関わる matrix metalloprotease 群があげられる。その他 diacylglycerol 合成酵素、ホスファチジン酸ホスファターゼ、ホスファチジルセリン合成酵素などの膜脂質代謝酵素、adenylate cyclase などのシグナル伝達に関する酵素があげられる。

膜結合型の酵素基質蛋白質としては、シグナル伝達、転写調節に関わる蛋白質としてステロール調節蛋白質 (SREBP)、Notch、Irel、ATF6 などがあげられ、またその他アミロイド前駆体蛋白質 (Amyloid precursor protein)、TNF α (tumor necrosis factor) precursor、Stem cell factor、M-CSF (monocyte colony stimulating factor) precursor、Klotho などがあげられる。

膜結合型酵素活性化因子としては、プレセニリン(presenillin), SCAP(SREBP cleavage activating protein), などがあげられる。

膜結合型輸送蛋白質としては、コレステロールなどの脂質を輸送する NPC (Niemann-Pick type c) 1、ABC(ATP-binding cassette)トランスポーター、カベオリン (caveolin)、脂肪酸トランスポーター(fatty acid transporter)があげられ、また GLUT1-4 などのグルコーストランスポーターを含む糖トランスポーター、glutamate transpoter、serotonin transporter などのアミノ酸トランスポーターなどがあげられる。また細胞内ベジクル間の物質輸送に関する膜蛋白質として Sec12 などがあげられる。

さらに膜を透過しない分子をある条件のもとに選択的に通過させるチャネル蛋白質があげられる。その中には水の選択的チャネルであるアクアポリンファミリー、またカリウムイオン、カルシウムイオン、ナトリウムイオンなどに対する選択的チャネルであるイオンチャネルなどがあげられる。

その他膜の構造蛋白質および接着に関与する蛋白質として、NCAM(Neural cell adhesion molecule)、ICAM(interecellular adhesion molecule)、カドヘリンファミリー、インテグリン、デスマコリン、デスマグレイン、L-selectin、connexin、グリコプロテインなどがあげられる。また免疫細胞において抗原提示に関わる主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC)，蛋白質の高次構造形成に関わると考えられる calnexin、PDI(protein disulfide isomerase)、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)、major prion protein precursor(プリオン)などのシャペロン蛋白質があげられる。

本発明では、上記したような目的蛋白質をコードする遺伝子を含む少なくとも1種の組換えバキュロウイルスを使用する。

昆虫に感染して病気を起こすウイルスであるバキュロウイルスは、環状の二本鎖DNAを遺伝子としてもつエンベロープウイルスで、鱗翅目、膜翅目および双翅目などの昆虫に感受性を示す。バキュロウイルスの中で、感染細胞の核内に多角体（ポリヒドラ）と呼ばれる封入体を大量につくる一群のウイルスが核多角体病ウイルス（NPV）である。多角体は、分子量31kDaのポリヘドリンタンパクより構成され、感染後期に大量につくられその中に多数のウイルス粒子を埋め込んでいる。多角体はウイルスが自然界で生存するためには必須であるが、ウイルスの増殖そのものには必要ないので、多角体遺伝子の代わりに発現させたい外来遺伝子を挿入してもウイルスは全く支障なく感染し増殖する。

本発明で用いられるバキュロウイルスとしては、NPVのキンウワバ科のオートグラファ・カリフォルニカ (Autographa californica) NPV (AcNPV) やカイコのボンビックス・モリ (Bombyx mori) NPV (BmNPV) など

のウイルスがベクターとして用いることができる。

A c N P Vの宿主（感染、継代細胞）としてはス Podoptera frugiperda (Spodoptera frugiperda) 細胞 (S f 細胞) などが挙げられ、B m N P Vの宿主（感染、継代細胞）としてはB m N 4 細胞などが挙げられる。S f 細胞は、B m N 4 細胞などに比べ増殖速度が速いこと、また、A c N P Vはヒト肝細胞およびヒト胎児腎細胞などにも感染する能力を有することから、A c N P V系のベクターが好ましい。

宿主としては、Spodoptera Frugiperda 細胞系統 Sf9 および Sf21 などが S. frugiperda 幼虫の卵巣組織から確立しており、Invitrogen 社あるいは Pharmingen 社 (San Diego, CA)、又は ATCC などから入手可能である。さらに、生きている昆虫幼虫を宿主細胞系として使用することもできる。

本発明で用いる組換えウイルスを構築する方法は、常法に従って行えばよく、例えば次の手順で行うことができる。

先ず、発現させたい蛋白質の遺伝子をトランスファーベクターに挿入して組換えトランスファーベクターを構築する。

トランスファーベクターの全体の大きさは一般的には数 kb ~ 10 kb 程度であり、そのうちの約 3 kb はプラスミド由来の骨格であり、アンピシリン等の抗生素耐性遺伝子と細菌のDNA複製開始のシグナルを含んでいる。通常のトランスファーベクターではこの骨格以外に、多角体遺伝子の 5' 領域と 3' 領域をそれぞれ数 kb ずつ含み、以下に述べるようなトランスフェクションを行った際に、この配列間で目的遺伝子と多角体遺伝子との間で相同組換えが引き起こる。また、トランスファーベクターには蛋白質遺伝子を発現させるためのプラモーターを含むことが好ましい。プロモーターとしては、多角体遺伝子のプロモーター、p 10 遺伝子のプロモーター、キャップシド遺伝子のプロモーターなどが挙げられる。

トランスファーベクターの種類は特に限定されない。トランスファーベクターの具体例としては、A c N P V系トランスファーベクターとしては、p E V m X

IV2、pAcSG1、pVL1392／1393、pAcMP2／3、pAcJP1、pAcUW21、pAcDZ1、pBlueBacIII、pAcUW51、pAcAB3、pAc360、pBlueBacHis、pVT-Bac33、pAcUW1、pAcUW42／43などが挙げられ、BmNPV系トランスマーカーとしてpBK283、pBK5、pBB30、pBE1、pBE2、pBK3、pBK52、pBKblue、pBKblue2、pBFシリーズ（以上、フナコシ株式会社、藤沢薬品工業株式会社等から入手可能）などが挙げられる。

次に、組換えウイルスを作製するために、上記の組換えトランスマーカーをウイルスと混合した後、宿主として用いる培養細胞に移入するか、あるいは予めウイルスで感染させた宿主として用いる培養細胞に上記のトランスマーカーを移入し、組換えトランスマーカーとウイルスゲノムDNAとの間に相同組み換えを起こさせ、組み換えウイルスを構築する。

ここで宿主として用いる培養細胞とは、上記した宿主が挙げられ、通常、昆虫培養細胞（Sf9細胞やBmN細胞など）である。培養条件は、当業者により適宜決定されるが、具体的にはSf9細胞を用いた場合は10%ウシ胎児血清を含む培地で、28°C前後で培養することが好ましい。このようにして構築された組み換えウイルスは、常法、例えばplaques assayなどによって精製することができる。なお、このようにして作製された組み換えウイルスは、核多角体病ウイルスの多角体蛋白質の遺伝子領域に外来のDNAが置換または挿入されており多角体を形成することができないため、非組み換えウイルスと容易に区別することができる。

本発明では、前記の組み換えバキュロウイルスを、上記した適当な宿主(Spodoptera Frugiperda細胞系統Sf9およびSf21などの培養細胞、又は昆虫幼虫など)に感染させ、一定時間後（例えば、72時間後等）に培養上清から細胞外発芽ウイルス(budded virus, BV)を遠心などの分離操作によって回収することにより、目的蛋白質を回収することができる。なお、組み換えバキュロウイルスは1種類のみ

感染させてもよいし、2種類以上の組換えバキュロウイルスを組み合わせて共感染させてもよい。

細胞外発芽バキュロウイルスの回収は、例えば、以下のように行うことができる。

先ず感染細胞の培養液を500～1,000gで遠心分離して、細胞外発芽バキュロウイルスを含む上清を回収する。この上清を約30,000～50,000gで遠心分離して細胞外発芽バキュロウイルスを含む沈殿物を得る。この沈殿物を適当な緩衝液に懸濁することにより、細胞外発芽バキュロウイルスを含むウイルス(BV)画分を得ることができる。

本発明では上記のようにして得られる目的蛋白質を有するバキュロウイルスの発芽ウイルスを物理化学的手法で処理することにより、ヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープとを分離する。

本発明で用いる物理化学的手法とは、バキュロウイルスの発芽ウイルスからヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープとを分離することができれば特に限定されないが、例えば、界面活性剤による処理と密度勾配遠心による分離操作、あるいは凍結融解による処理と密度勾配遠心による分離操作などが挙げられる。

本発明で用いることができる界面活性剤の種類は特に限定されないが、例えば、tween 20、triton X 305、などが挙げられ、特に好ましくは tween20 が挙げられる。

界面活性剤による処理は、発芽ウイルスを含む画分をPBS等の適当な緩衝液中の界面活性剤溶液（例えば、0.5% tween20/PBS 溶液）と混合し、室温で適当な時間静置することにより行うことができる。

凍結融解による処理としては、一般的には、ウイルス(BV)をPBSに懸濁し、-20°Cに冷却する。30分後に室温にもどし、融解させるという操作を、例えば三回程度繰り返す方法を挙げることができる。PBSの代わりに又はPBSと一緒にリン酸緩衝液又は水等の低張処理と組み合わせる方法や、温度をさらに下げる(-80°C又は液体窒素中等)方法、融解温度をより高温にする（例えば、

37°C等)方法など、より急激に凍結融解を行う方法を採用することもできる。凍結融解による処理としては、このような条件を適宜組み合わせることにより、最適な条件を設定することができる。

本発明で用いるその他の物理化学的手法としては、超音波処理や、圧をかけておいて急激に減圧する方法などを挙げることができる。

超音波処理としては、例えば、ウイルスを PBS に懸濁し, Branson の Sonifier 250 などの機械で、氷上で 20 秒を三回程処理する方法が挙げられるが、これより穏やかな条件で行う方が好ましい場合もある。

また、圧をかけておいて急激に減圧する方法とは、具体的には、Nitrogen cavitation 装置などの装置を用いて、圧をかけて N₂ を溶解させておいて一気に減圧することにより N₂ を気化させることにより細胞を破壊するという原理に基づく方法である。あるいは、French press という細胞破壊法も利用可能であり、具体的には、細胞の懸濁液に圧をかけて細い穴を通すことによって破壊する方法である。

上記した通り、本発明で用いる物理化学的手法の手段は特には限定されないが、特に好ましくは、界面活性剤による処理と密度勾配遠心による分離操作が挙げられる。

本発明では、上記したようにバキュロウイルスの発芽ウイルスを界面活性剤または凍結融解で処理した後に、密度勾配遠心による分離操作を行う。

密度勾配遠心としては、例えば、ショ糖密度勾配超遠心を行うことができる。具体的には、適当な濃度勾配（例えば、66.5%、45%、及び 30%など）をつけてショ糖溶液を重層し、その上層に界面活性剤又は凍結融解で処理した発芽ウイルス含有溶液を重層し、例えば 100,000 g ~ 500,000 g (一例としては 350000 g) で一定時間遠心した後、最下層より分画する。

各画分のショ糖濃度（屈折率計）と蛋白濃度（バイオラッドプロテインアッセイシステム、BSA スタンダード）を測定し、ポリアクリルアミド SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) をを行い、次いで銀染色を行うことによりタンパク質を確認すること

ができる。これにより、ウイルス蛋白質が存在すると考えられる画分を同定することができる。さらに、ウイルス蛋白質が存在すると考えられる画分を電子顕微鏡で詳細に観察することにより、ヌクレオカプシッドを含まずにウイルスエンベロープを含む画分を単離することができる。

上記した方法により得られる、目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープも本発明の範囲内のものである。

本発明はさらに、上記した方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを用いて、該ウイルスエンベロープ上に発現されている目的蛋白質と被験物質との相互作用を測定することを含む、化学物質のスクリーニング方法に関する。

スクリーニングに供される化学物質としては、例えばペプチド、ポリペプチド、合成化合物、微生物発酵物、生物体（植物又は動物の組織、微生物、又は細胞などを含む）からの抽出物、あるいはそれらのライブラリーが挙げられる。ライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）、ペプチドライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）などが挙げられる。スクリーニングに供される化学物質は、天然物でも合成物でもよく、また候補となる単一の化学物質を独立に試験しても、いくつかの候補となる化学物質の混合物（ライブラリーなどを含む）について試験をしてもよい。また、細胞抽出物のような混合物を分画したものについてスクリーニングを行い、分画を重ねて、所望の活性を有する物質を単離することも可能である。

これらの化学物質は、ウイルスエンベロープ上に発現した目的蛋白質（好ましくは膜蛋白質、特に好ましくは、膜結合型受容体、膜結合型酵素、該膜結合型酵素の基質、膜結合型酵素活性化因子、膜結合型輸送蛋白質、チャネル蛋白質、膜の構造蛋白質、接着関与蛋白質、抗原提示に関わる蛋白質、又は蛋白質の高次構造形成に関わる蛋白質などから選択される膜蛋白質）と相互作用することが予想される物質であり、さらに好ましくは、上記蛋白質に対する阻害薬または活性化薬物である。

本発明はさらに、上記した方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを用いて、該ウイルスエンベロープ上に発現されている目的蛋白質に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作製する方法、並びに該方法により得られるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体に関する。

本発明の抗体の作製方法では、上記した方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを免疫原として用いる。

抗体の作成は定法により行うことができる。ポリクローナル抗体を作製する場合には、目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫感作することができる。免疫感作は、通常の免疫感作の方法に従い、例えば抗原を1回以上投与することにより行うことができる。

抗原投与は、例えば、7から30日、特に12から16日間隔で2または3回投与することが好ましく、投与量も適宜選択できる。抗原の投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹膜腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができるが、静脈内、腹膜腔内もしくは皮下に注射することにより投与することが好ましい。また、抗原は適当な緩衝液、例えば完全フロイントアジュバント、R A S [MPL(Monophosphoryl Lipid A)+TDM(Synthetic Trehalose Dicorynomycolate)+CWS(Cell Wall Skeleton) アジュバントシステム]、水酸化アルミニウム等の通常用いられるアジュバントを含有する適当な緩衝液に溶解して用いることができるが、投与経路や条件等によっては、上記したアジュバントは使用しない場合もある。

免疫感作した哺乳動物を、例えば0.5から4ヶ月間飼育した後、該哺乳動物の血清を耳静脈等から少量サンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、状況に応じて抗原の投与を適当回数実施する。例えば $100\mu g$ ～ $1000\mu g$ の抗原を用いて追加免疫を行なう。最後の投与から1～2ヶ月後に免

疫感作した哺乳動物から通常の方法により血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、所望のポリクローナル抗体を得ることができる。

また、モノクローナル抗体を作製する場合には、例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマを作製することにより所望のモノクローナル抗体を得ることができる。モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、以下のような細胞融合法によって得ることができる。

抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、Bリンパ球等を使用する。抗原としては、目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを使用する。免疫される動物としてはマウス、ラット等が使用され、これらの動物への抗原の投与は常法に従って行う。例えば完全フロイントアジュvant、不完全フロイントアジュvantなどのアジュvantと抗原である発芽バキュロウイルスとの懸濁液もしくは乳化液を調製し、これを動物の皮下、皮内、腹腔内等に数回投与することによって動物を免疫化する。免疫化した動物から抗体産生細胞として例えば脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞とをそれ自体公知の方法 (G.Kohler et al ., Nature, 256 495(1975)) により融合することにより、ハイブリドーマを作製することができる。細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスではP 3 X 6 3 A g 8、P 3 U 1 株、S p 2／0 株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選抜にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (H A T) 培地を常法に従って使用することができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングを行い、さらにスクリーニングを行なうことにより、所望の蛋白質を特異的に認識

するモノクローナル抗体を產生する細胞株を得ることができる。

このようにして得られたハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫安分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーなどを適宜組み合わせて使用できる。

本発明はさらに、上記した方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを溶解剤で処理し、該目的蛋白質を可溶化および精製する方法。

具体的には、目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを適当な緩衝液に懸濁し、lyso-phosphatidylcholin 等の溶解剤で処理し、さらに遠心分離（例えば、30000 r p m等）を行うことにより上清と沈澱に分離することができる。可溶化された目的蛋白質は上清中に回収される。

本出願の優先権主張の基礎となる特願2000-215416号明細書に記載の内容は全て引用により本明細書中に取り込むものとする。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

実施例1：ステロール調節蛋白質（SREBP-2）発現細胞外バキュロウイルスの界面活性剤処理および超遠心によるエンベロープの分離

(1) ステロール調節蛋白質（SREBP-2）

SREBP 2 は LDL 受容体や HMG-CoA 還元酵素など細胞内コレステロール調節に関わる酵素や輸送タンパク質のコレステロール依存性の転写調節をつかさどる転写因子である (Brown MS, Goldstein J., Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Sep 28;96(20):11041-8, A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood.)。SREBP 2 は、定常状態では 1 2

5 kd の 2 回膜貫通型の前駆体蛋白質として小胞体膜に存在する。細部内のコレステロールが欠乏すると、SREBP 2 前駆体タンパク質の膜貫通部位付近でプロテアーゼによる 2 段階の切断がおこり、SREBP 2 の DNA 結合部位を含むアミノ端が膜から切りはなされて細胞質に放出され、さらに核へと移行する。そして様々なコレステロール調節遺伝子のプロモーター領域上の sre 配列に結合することにより、転写を活性化する。

(2) リコンビナントバキュロウイルスの作成と Sf 9 細胞培養

ヒト SREBP 2 全長遺伝子 (Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X., Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Dec 15; 90(24):11603-7., SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element.) を pBlueBacTM ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に組み込んだ。Sf 9 細胞 (Invitrogen) は 10 % ウシ胎児血清 (Sigma)、penicillin 100 units/ml、streptomycin 100 μg/ml を含む Grace's supplemented media (GIBCO BRL) で 27 °C で 10 cm 径ディッシュに継代培養した。リコンビナントバキュロウイルスの作成は説明書 (Bac-N-BlueTM Transfection Kit, Invitrogen) に従い、Sf 9 細胞に Bac-N-Blue DNA (ApMNPV 由来) と 4 μg の pBlueBac-SREBP2 とを共感染させ SREBP 2 組換えウイルスを作成した。

(3) ウィルスへの SREBP 2 の発現とウィルスの回収

大量発現のため、Sf 9 細胞を 15 cm ディッシュ 8 枚に 1 ディッシュあたり 2 × 10⁷ 細胞の濃度で培養し、そこに SREBP 2 組換えウイルスを MOI (multiplicity of infection) 5 で感染させ、48 時間後に培養上清を集めた。集めた培養上清は 800 g、10 分の遠心により細胞を取り除き、その上清を 4000 g、20 分超遠心して、その沈澱を 4 ml のリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) に懸濁し、ウィルス (BV) 画分とした (Loisel TP, 他, Nat Biotechnol. 1997 Nov; 15(12):1300-4)。

(4) ウィルスの界面活性剤処理とショ糖密度勾配超遠心による EVE の分画

SREBP2 発現 BV 画分の $250\mu\text{l}$ と 0.5% tween20/PBS 溶液 $250\mu\text{l}$ と 1 : 1 混合し、室温で 10 分間静置処理した。

66.5% (W/V) ショ糖/PBS 溶液 0.5ml , 45% (W/V) ショ糖/PBS 溶液 1.0ml , 30% (W/V) ショ糖/PBS 溶液 1.0ml の順に重層し、その上層に上記の SREBP2 発現 BV 画分の tween20 処理溶液 0.5ml を重層し、 350000g で 2 時間遠心した後、最下層より $100\mu\text{l}$ ずつ分画した。

各画分のショ糖濃度（屈折率計）と蛋白濃度（バイオラッドプロテインアッセイシステム、BSA スタンダード）を測定した（図 1）。3～18 画分については、サンプル $10\mu\text{l}$ に 5 x SDS バッファー（2 M Tris-HCl, pH6.8, 15% β -mercaptoethanol, 15% SDS, 50% glycerol, 1.5% bromophenolblue） $2.5\mu\text{l}$ 加え 95°C 10 分熱処理後 12% ポリアクリルアミド SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、銀染色（第一化学キット）によりタンパク質を染色した結果、8～13 画分に gp 6.4、VP 3.9 などのウイルスタンパクと考えられるタンパク質バンドがみられた（図 2）。そこで 8～13 画分については電子顕微鏡（AKASHI EM002A）で観察をおこなった（9～12 画分の電子顕微鏡観察の結果を図 3 から図 6 に示す）。

(5) 電子顕微鏡観察とウエスタンウエスタンプロッティング

電子顕微鏡観察は以下のように行なった。試料観察用 400 グリッドメッシュにコロジオン膜を貼り、続いて炭素蒸着（カーボンコート）した。試料が吸着し易いように、400 グリッドメッシュには予めイオンコーティーによりエッチング処理を施した。試料 $10\mu\text{l}$ を 400 グリッドメッシュにのせ、乾燥させた後、2% リンタングステン酸 (PTA) 溶液で陰性染色して観察した。

ショ糖密度勾配超遠心の画分では BV はタンパク染色に一致して、蔗糖濃度 44.5～34.5% の範囲で回収され（8～13 画分）、9 画分にはヌクレオカプシッド（図 3）、ショ糖濃度 37.0% の 12 画分にはウイルスエンベロープ (EVE) が濃縮されており（図 6）、10、11 画分はヌクレオカプシッドとエンベロープの混在した像が観

察された(図4及び図5)。SDS-PAGE上VP39と考えられる分子量39キロダルトンのタンパク質は電子顕微鏡のヌクレオカプシッド像と一致するように分布し、またウイルスエンベロープに存在する唯一のウイルスタンパク質として知られている分子量64キロダルトンのgp64のSDS-PAGEでのタンパクバンドの濃さと電子顕微鏡のエンベロープ像の分布は一致している(図2、並びに図3~6)。

さらにSREBP2に対する特異抗体を用いて免疫染色(ウェスタンプロット)を行うため、これらのサンプルを8%SDS-PAGEでゲル電気泳動したのち、38V20時間ニトロセルロース膜(Hybond ECL, Amersham)に転写した。転写膜はブロックエースで30分ブロッキング後、SREBP2のカルボキシル末端を認識するモノクローナル抗体1C6(ATCC No CRL-2224)の塩析精製抗体(10 μ g/ml)を室温で1時間反応させ、TBS(20 mM Tris-buffered saline, pH7.4)で4回洗浄後peroxidase conjugated抗マウスIgG抗体(CAPPEL)で1時間反応、TBSで同様に洗浄後、ECL試薬(Amersham pharmacia)で化学発光させ、X線フィルムに感光させた。

その結果、126kdのSREBP2前駆体タンパク質と一致するバンドがEVEの分布と一致して認められ(図7)、ウイルスエンベロープに発現した膜タンパク質SREBP2がEVEに濃縮されたと考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明により、発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープを分離し、目的膜蛋白質が発現されたウイルス膜画分(enucleated virion envelope, EVE)を回収するための簡易な方法が提供されることになった。

本発明の方法を利用することにより、目的膜蛋白質を濃縮することができ、またウイルスのDNAやヌクレオカプシッドの蛋白質によるアッセイ系の妨害を回避することができる。また膜の内側(ヌクレオカプシッド側)に活性部位がある膜蛋白質や他の蛋白質や化学物質と相互作用する蛋白質などでは膜の一部が破壊されていて、外から加えた基質や化学物質が活性部位や相互作用部位に到達可能で

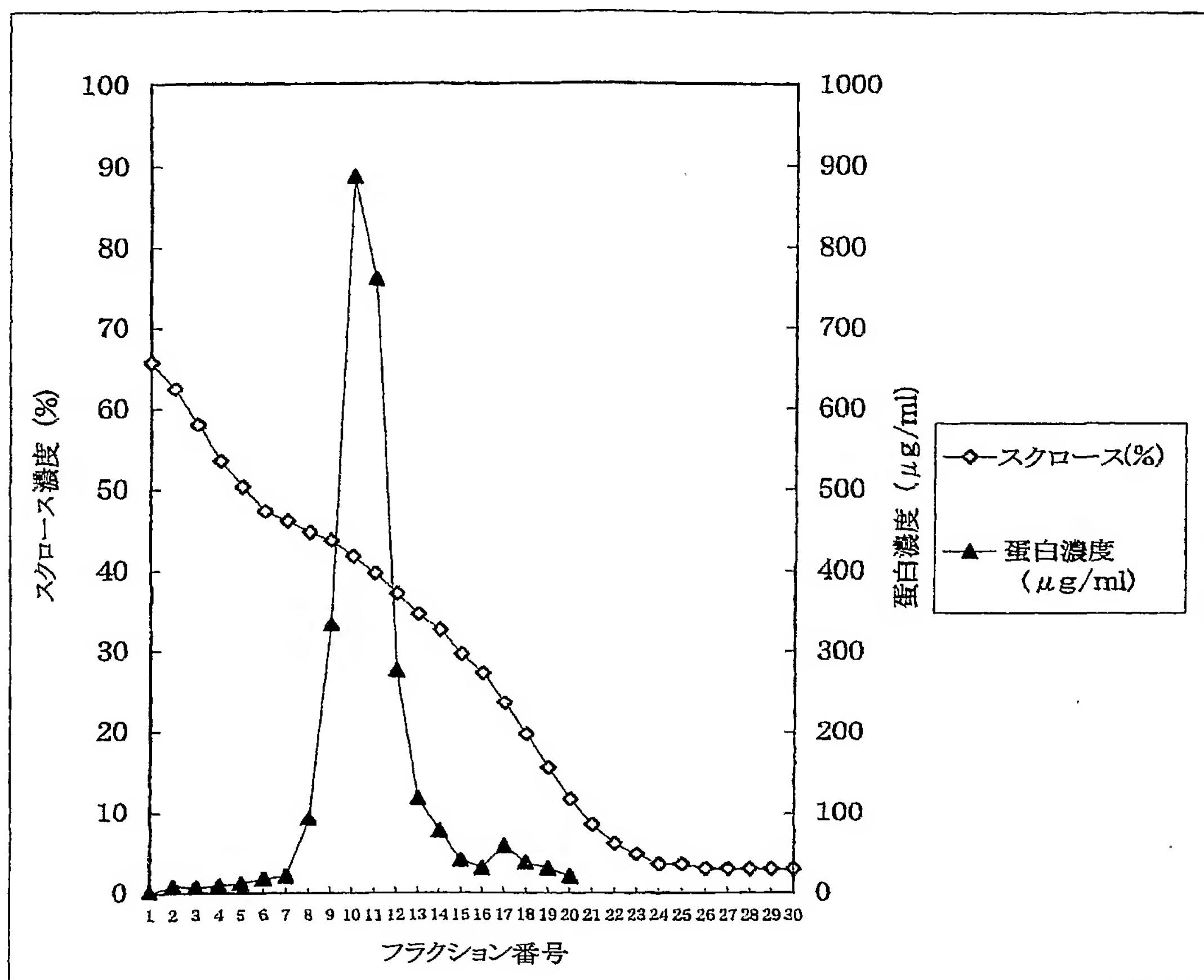
ある必要がある。このような場合にも EVE 技術はウイルスそのものを使用するよりも優れている。

請求の範囲

1. 目的蛋白質が発現されたバキュロウイルスの発芽ウイルスを物理化学的手法で処理することを含む、該発芽ウイルスのヌクレオカプシッドとウイルスエンベロープとを分離してウイルスエンベロープを回収する方法。
2. 物理化学的手法による処理が、界面活性剤による処理または凍結融解による処理と密度勾配遠心による分離操作である、請求項1に記載の方法。
3. 界面活性剤として tween20 を使用する、請求項1又は2に記載の方法。
4. 目的蛋白質が膜蛋白質である、請求項1から3の何れかに記載の方法。
5. 請求項1から4の何れかに記載の方法により得られる、目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープ。
6. 請求項1から4の何れかに記載の方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを用いて、該ウイルスエンベロープ上に発現されている目的蛋白質と被験物質との相互作用を測定することを含む、化学物質のスクリーニング方法。
7. 請求項1から4の何れかに記載の方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを用いて、該ウイルスエンベロープ上に発現されている目的蛋白質に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作製する方法。
8. 請求項7に記載の方法により得られるポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体。
9. 請求項1から4の何れかに記載の方法により得られる目的蛋白質が発現されたウイルスエンベロープを溶解剤で処理し、該目的蛋白質を可溶化および精製する方法。

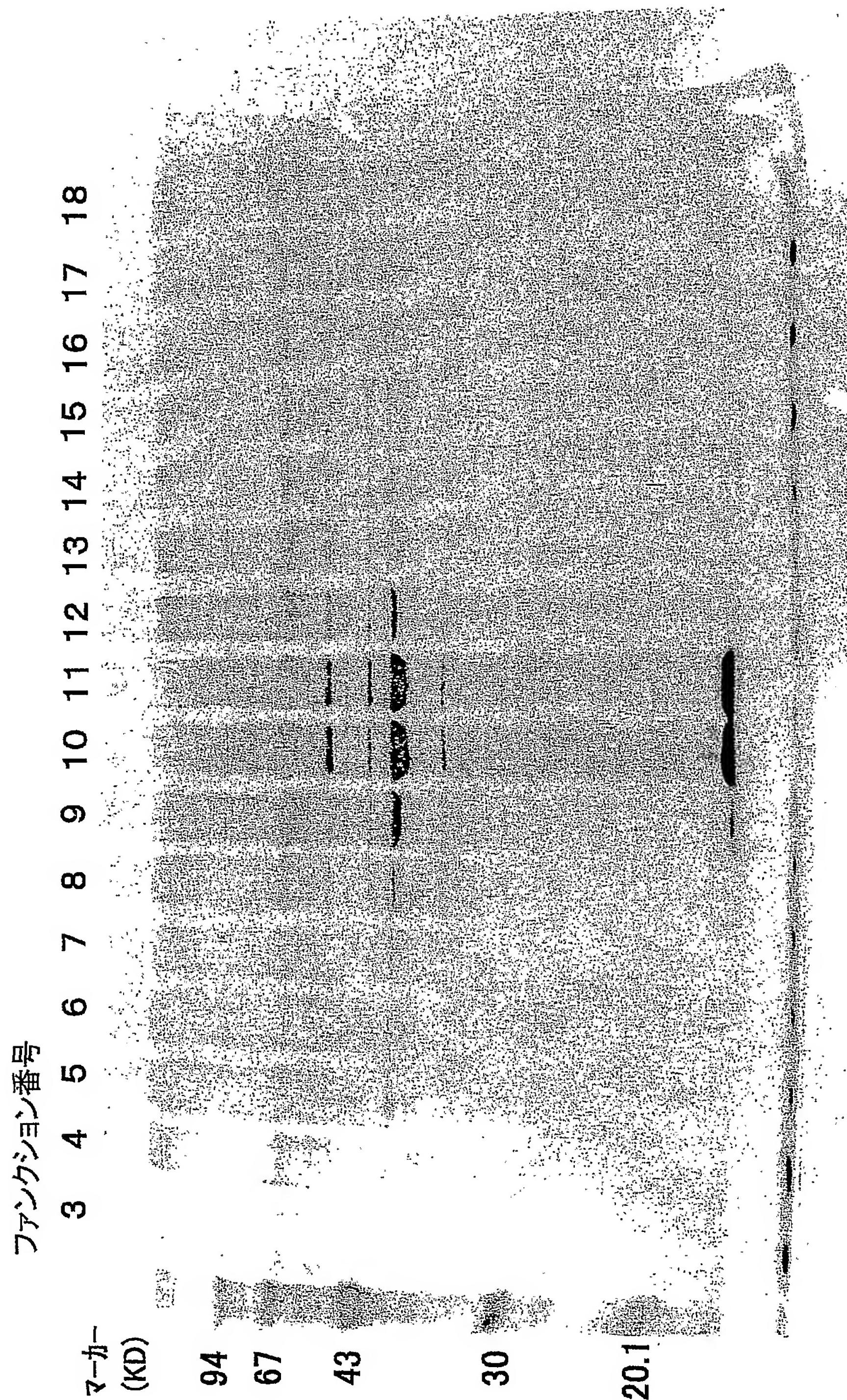
第1図

図1 SREBP-2 超遠心フラクションパターン



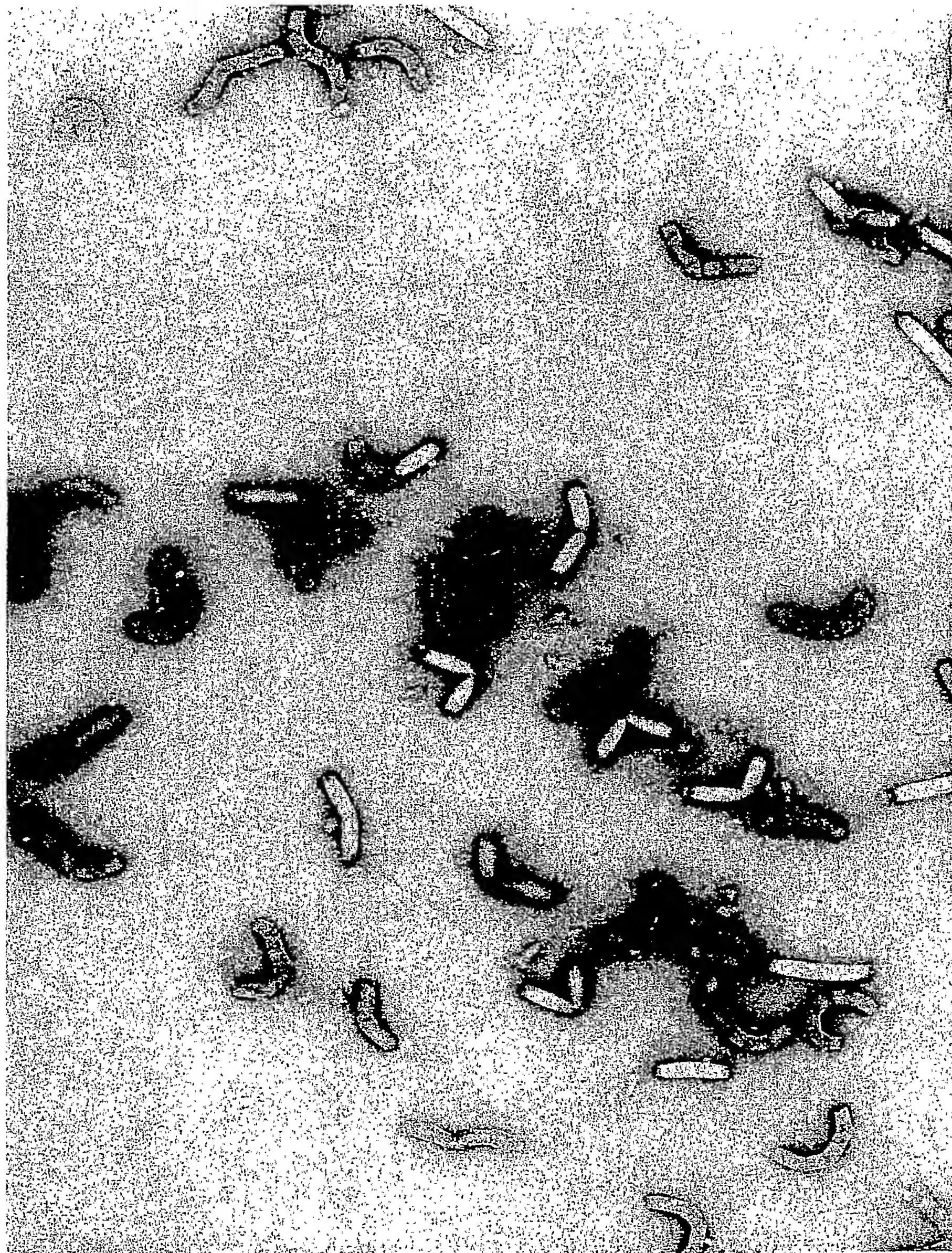
1Fr : 100 μl

図 2 節

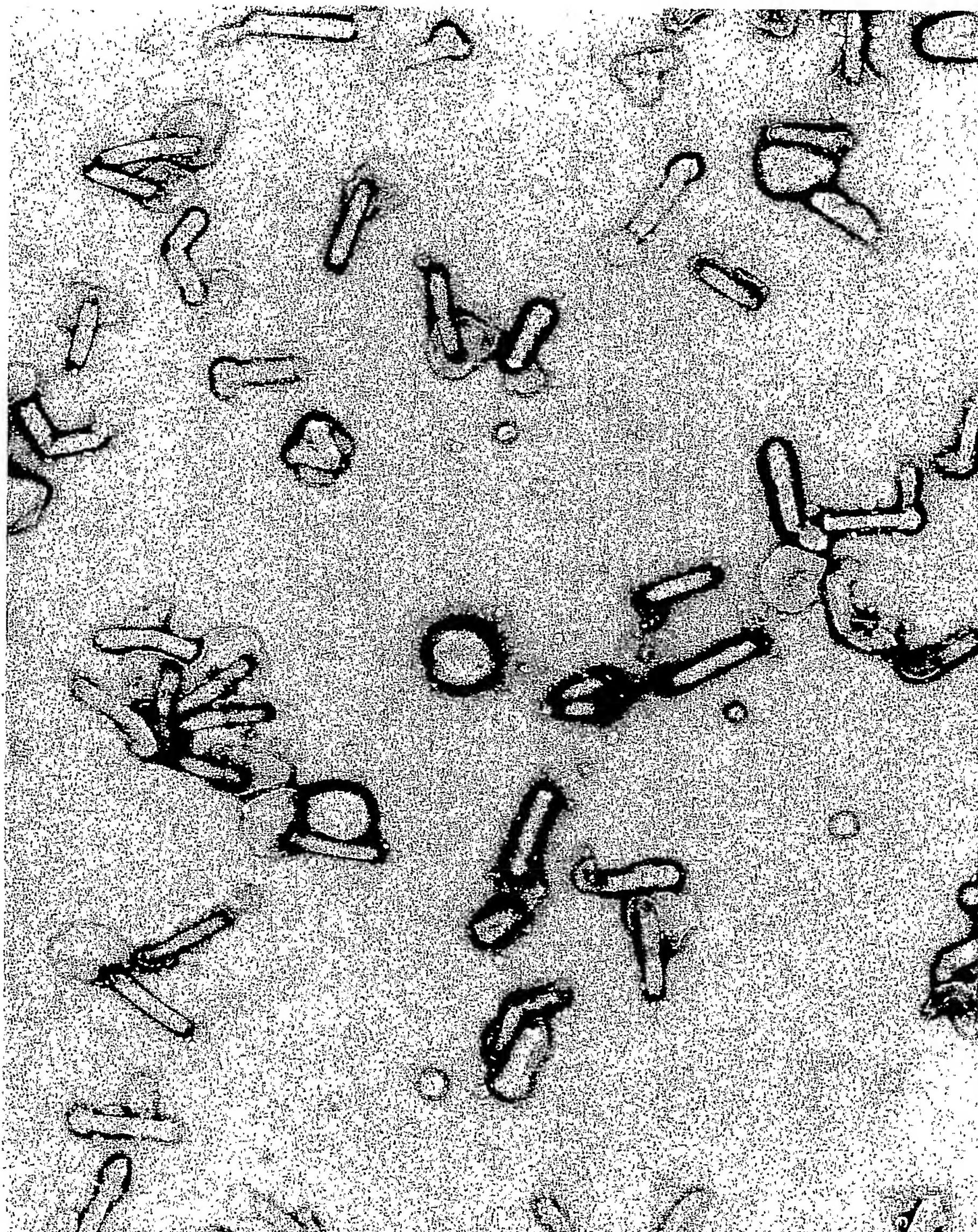


第3図

フラクション9×22000

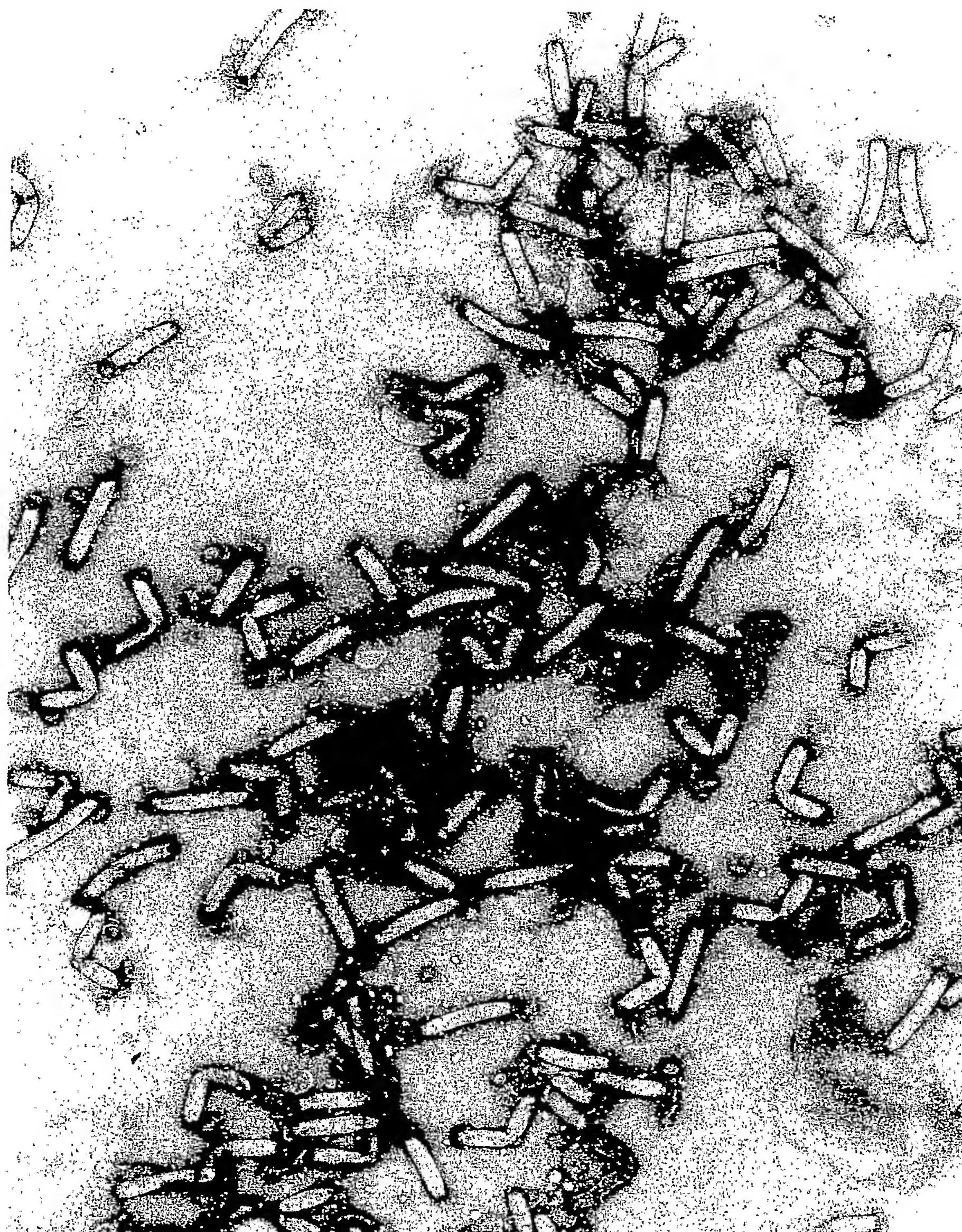


第4図

フラクション 10×22000 

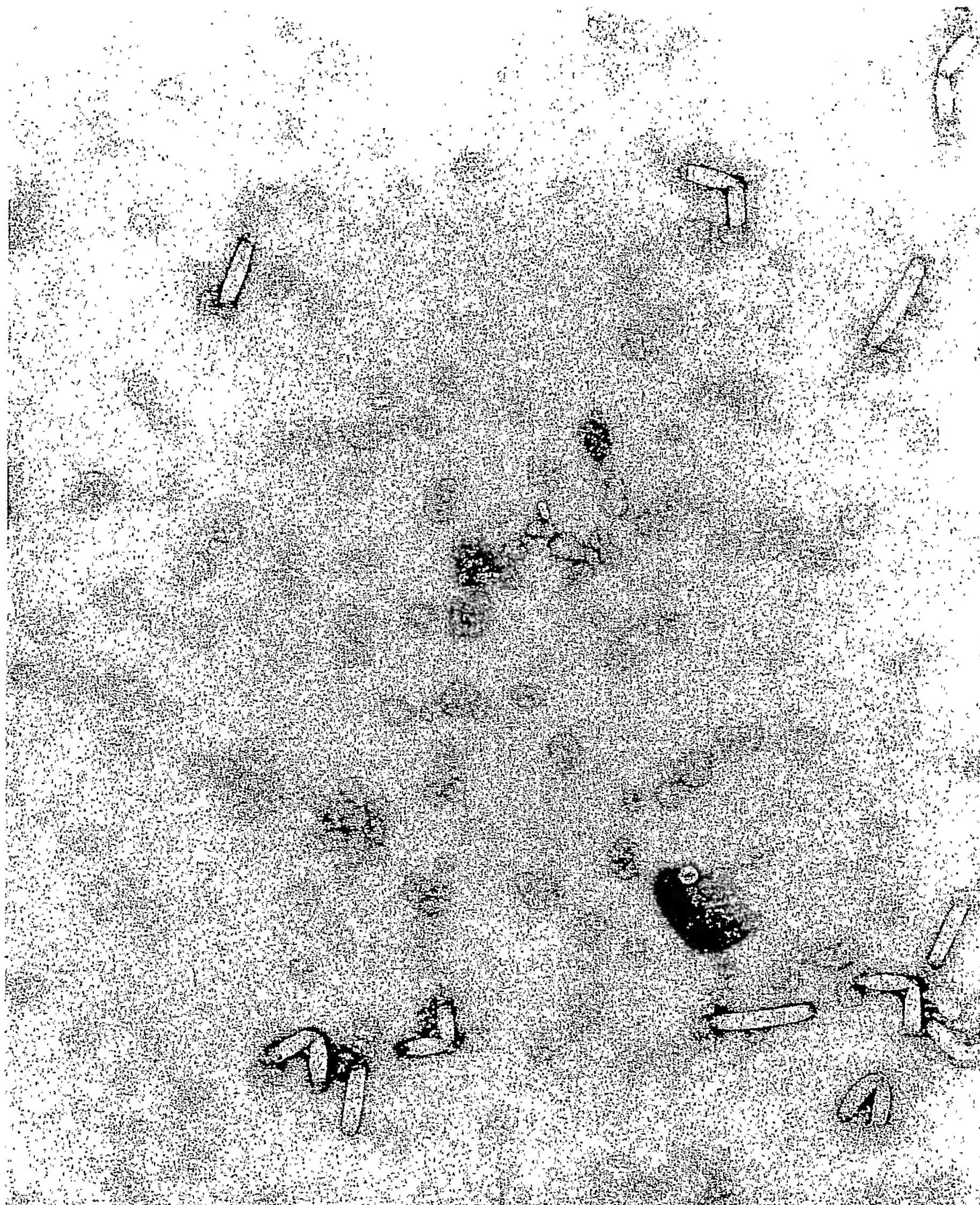
第 5 図

フラクション 11 × 22000

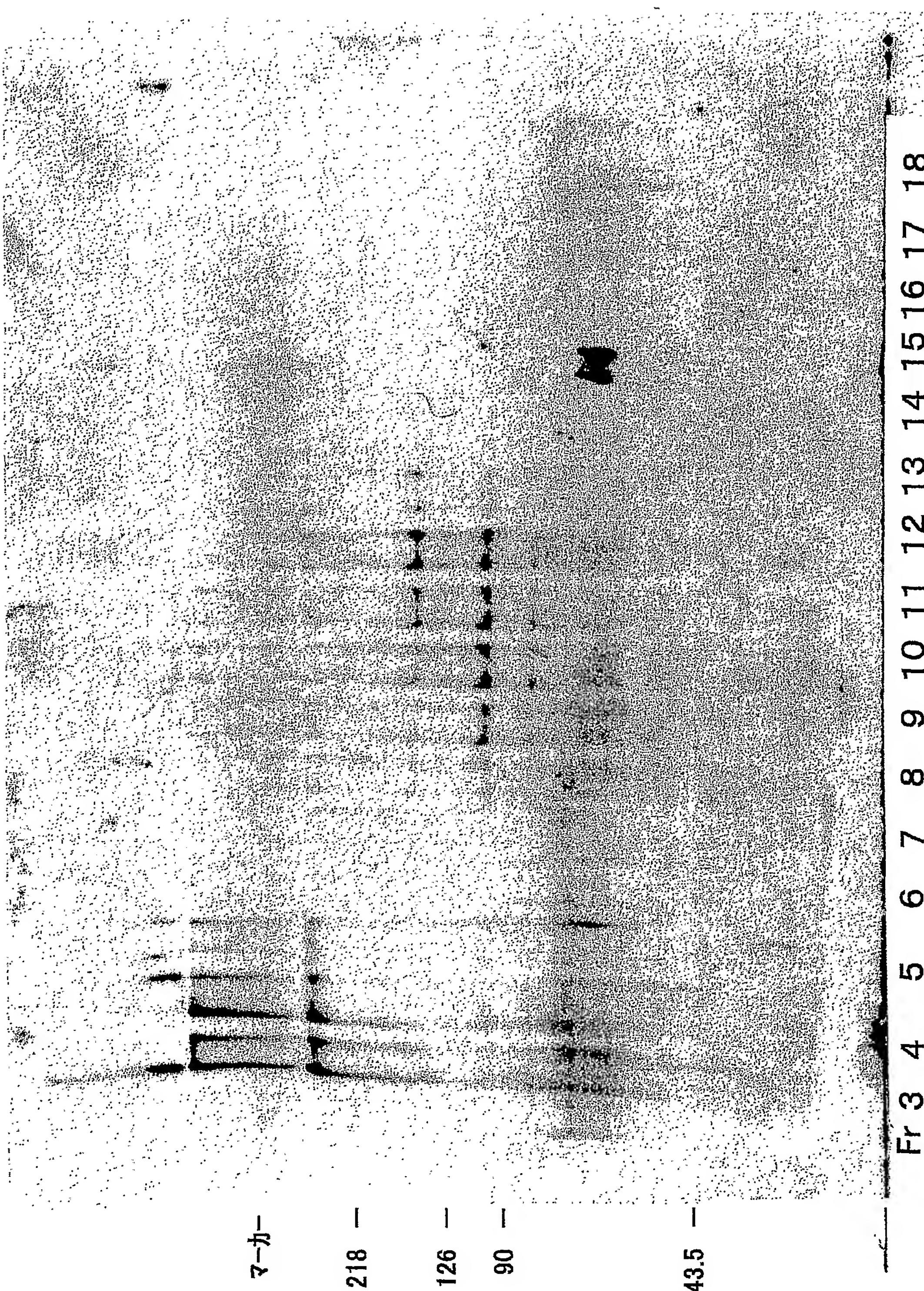


第6図

フラクション 12×2200



第7図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K1/14, C07K14/01, C12N15/02, C07K16/00, C12P21/08, G01N33/15,
G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K1/14, C07K14/01, C12N15/02, C07K16/00, C12P21/08, G01N33/15,
G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 265785 A2 (Microgenesys, Inc.), 04 May, 1988 (04.05.88), & JP 63-207397 A	1-9
A	WO 94/16681 A1 (S.E.P.P.I.C., Societe d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques), 04 August, 1994 (04.08.94), & EP 681470 A1 & JP 8-505866 A	1-9
A	EP 721505 A1 (Innogenetics N.V.), 17 July, 1996 (17.07.96), & WO 96/04385 A2 & US 6150134 A & JP 9-503396 A	1-9
A	WO 98/21338 A1 (The Government of the United States of America, as represented by The Secretary, Department of Health and Human Services), 22 May, 1998 (22.05.98), & EP 941337 A1 & JP 2001-504337 A	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 October, 2001 (15.10.01)

Date of mailing of the international search report
30 October, 2001 (30.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C07K1/14, C07K14/01, C12N15/02, C07K16/00, C12P21/08,
G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C07K1/14, C07K14/01, C12N15/02, C07K16/00, C12P21/08,
G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 265785 A2 (マイクロジエネシス, インコーポレーテッド) 4.5月. 1988 (04.05.88) & JP 63-207397 A	1-9
A	WO 94/16681 A1 (ソシエテ・デ・クスピ・ロタシオン・ド・ウ・ブロデュイ・ブルー・アンデウスト リ・シック・エス・エ・ペ・ペ・イ・セ) 4.8月. 1994 (04.08.94) & EP 681470 A1 & JP 8-505866 A	1-9
A	EP 721505 A1 (ソノジエネティクス・エヌ・ブイ) 17.7月. 1996 (17.07.96) & WO 96/04385 A2 & US 6150134 A & JP 9-503396 A	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 10. 01	国際調査報告の発送日 30.10.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488  4N 9637

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 98/21338 A1 (ザ カヴァメント オブ ザ エイテッド ステイツ オブ アメリカ、レブリゼンテッド バイザ セクレタリー、デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サーヴィスズ) 22.5月.1998 (22.05.98) & EP 941337 A1 & JP 2001-504337 A	1-9